

11.11.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

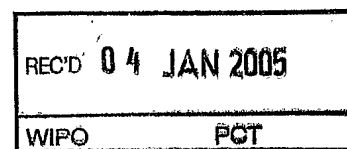
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 3月30日
Date of Application:

出願番号 特願2004-101320
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2004-101320]

出願人 社団法人芝蘭会
Applicant(s):

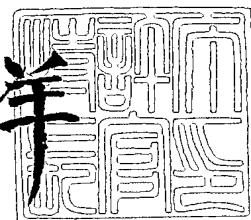



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川 洋





【書類名】 特許願
【整理番号】 A6267
【提出日】 平成16年 3月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎徳成町 2 3 - 6 一浦マンション 4 - B
 号室
 【氏名】 篠原 隆司
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎徳成町 2 3 - 6 一浦マンション 4 - B
 号室
 【氏名】 篠原 美都
【特許出願人】
 【識別番号】 503310763
 【氏名又は名称】 社団法人芝蘭会
【代理人】
 【識別番号】 100080791
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高島 一
 【電話番号】 06-6227-1156
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 006965
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む、多能性幹細胞の製造方法。

【請求項 2】

培地が更に白血病抑制因子 (LIF) を含む、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

培地が更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれかを含む、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 4】

精巢細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 5】

以下の工程を含む、請求項 1 に記載の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、培養細胞を得る工程；

(工程 2) 白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて、工程 1 で得られた培養細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程。

【請求項 6】

工程 1 の培地が更に白血病抑制因子 (LIF) を含む、請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 7】

工程 1 の培地が更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれかを含む、請求項 5 又は 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 8】

工程 1 が精巢細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 9】

精巢細胞が哺乳動物由来である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

哺乳動物が出生後である、請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】

多能性幹細胞が SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EpcAM、CD9、EE2 及び c-kit からなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 12】

多能性幹細胞が SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EpcAM、CD9、EE2 及び c-kit が陽性である、請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 13】

請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造された多能性幹細胞。

【請求項 14】

SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EpcAM、CD9、EE2 及び c-kit からなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、精巢細胞に由来する多能性幹細胞。

【請求項 15】

SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EpcAM、CD9、EE2 及び c-kit が陽性である、請求項 14 に記載の多能性幹細胞。

【請求項 16】

以下の工程を含む、キメラ胚の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて

精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程。

【請求項 17】

以下の工程を含む、キメラ動物（ヒトを除く）の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程；

(工程 3) 当該キメラ胚を宿主動物の子宮に移入し、キメラ動物（ヒトを除く）を得る工程。

【請求項 18】

以下の工程を含む、中胚葉系細胞の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を中胚葉系細胞分化条件にて培養し、中胚葉系細胞を得る工程。

【請求項 19】

中胚葉系細胞が、血球系細胞、血管内皮細胞および心筋細胞からなる群から選ばれるいずれかである、請求項 18 に記載の製造方法。

【請求項 20】

以下の工程を含む、神経系細胞の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を神経系細胞分化条件にて培養し、神経系細胞を得る工程。

【請求項 21】

神経系細胞が、神経細胞またはグリア細胞である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む、精巢細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物。

【請求項 23】

更に白血病抑制因子 (LIF) を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれかを含む、請求項 22 又は 23 のいずれかに記載の組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】精巣細胞由来多能性幹細胞の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、精巣細胞を用いて多能性幹細胞を製造する方法、当該方法により製造された多能性幹細胞、当該多能性幹細胞を用いてキメラ胚を製造する方法、当該キメラ胚を用いてキメラ動物を製造する方法、当該多能性幹細胞から中胚葉系細胞等の機能細胞を製造する方法、精巣細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物等に関する。

【背景技術】

【0002】

生殖細胞(germ cell)は子孫へ遺伝子を伝播する能力を有する点でユニークである。この細胞は生殖のための配偶子を作るために高度に特殊化されているが、多くの証拠によりこの細胞の多能性が示唆されている。例えば、テラトーマ(teratoma)は、生殖腺にほとんど常に発生し、多様な成熟段階の多種の細胞や組織を含む。さらに、胎児生殖細胞は特殊な条件下で培養した時に、多能性細胞を生ずることが知られている。これらの胚性生殖細胞(embryonic germ cell: E G細胞)は内部細胞塊(inner cell mass)から単離した胚性幹細胞(embryonic stem cell: E S細胞)に類似した分化特性を有している。これらの知見は、生殖系列(germline lineage)細胞は多能性細胞を生み出す能力を維持していることを強く示唆するが、出生後の正常生殖腺から多能性細胞が確立できたことはない。E S細胞及びE G細胞は、いずれも出生前の胚あるいは胎児から採取されるので、ヒトへの臨床応用に際しては、倫理上の大きな問題を有しており、出生後の個体から多能性細胞を樹立する技術の開発が求められていた。

本願発明者らは、体内において子孫へ遺伝情報を伝えることのできる唯一の幹細胞である、精原幹細胞のインビトロ培養方法を開発した(非特許文献1)。新生児の精巣細胞をグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、白血病抑制因子(LIF)、上皮細胞成長因子(EGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)等の存在下で培養すると、生殖細胞が固有の形状のコロニーを形成し、幹細胞が5ヶ月以上にわたり増殖した。不妊マウスの精細管に移植すると、培養した細胞は正常な精子及び子孫を産出し、テラトーマや体細胞への分化は認められないことから、生殖細胞系列に完全にコミットしていることが示された。これは精細管に移入するとテラトーマを生ずるE S細胞とは対照的である。これらの結果に基づき、本願発明者らは、この細胞をE S細胞やE G細胞と識別するために、生殖系列幹細胞(germline stem cell: G S細胞)と名づけた。即ち、G S細胞は生殖系列細胞を拡大させる第3の方法の意義があるが、E S/E G細胞とは分化能力において明らかに異なっている。

【非特許文献1】 バイオロジー オブ レプロダクション (Biology of Reproduction)、第69巻、p 612-616、2003年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上記事情に鑑み、本発明は、出生後の個体から多能性幹細胞を製造する新たな方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、新生マウスの精巣細胞をG S細胞培養と類似の条件下で培養すると、G S細胞のコロニーに加えて、E S細胞コロニーと識別がつかない形態を呈するコロニーが出現することを確認した。これらのE S様細胞はE S細胞培養条件下で選択的に増殖した。当該E S様細胞はヌードマウスの皮下等に移植するとテラトーマを発生すること、インビトロで多様な機能細胞へと分化誘導されること、当該E S様細胞を胚盤胞(blastocyst)内にマイクロインジェクションすることにより正常な胚発生が起り、生殖細胞も含む極めて多様な組織を形成することなどから、当該E S様細胞は、

ES細胞と同様に多能性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0005】

即ち、本発明は以下に関する。

(1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む、多能性幹細胞の製造方法。

(2) 培地が更に白血病抑制因子(LIF)を含む、上記(1)に記載の製造方法。

(3) 培地が更に上皮細胞成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の少なくともいずれかを含む、上記(1)又は(2)のいずれかに記載の製造方法。

(4) 精巢細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、上記(1)～(3)のいずれかに記載の製造方法。

(5) 以下の工程を含む、上記(1)に記載の製造方法:

(工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、培養細胞を得る工程;

(工程2) 白血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて、工程1で得られた培養細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程。

(6) 工程1の培地が更に白血病抑制因子(LIF)を含む、上記(5)に記載の製造方法。

(7) 工程1の培地が更に上皮細胞成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の少なくともいずれかを含む、上記(5)又は(6)のいずれかに記載の製造方法。

(8) 工程1が精巢細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、上記(5)～(7)のいずれかに記載の製造方法。

(9) 精巢細胞が哺乳動物由来である、上記(1)～(8)のいずれかに記載の製造方法。

(10) 哺乳動物が出生後である、上記(9)に記載の製造方法。

(11) 多能性幹細胞がSSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitからなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、上記(1)に記載の製造方法。

(12) 多能性幹細胞がSSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitが陽性である、上記(11)に記載の製造方法。

(13) 上記(1)～(12)のいずれかに記載の製造方法により製造された多能性幹細胞。

(14) SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitからなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、精巢細胞に由来する多能性幹細胞。

(15) SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -インテグリン、 $\alpha 6$ -インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitが陽性である、上記(14)に記載の多能性幹細胞。

(16) 以下の工程を含む、キメラ胚の製造方法:

(工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程;

(工程2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程。

(17) 以下の工程を含む、キメラ動物(ヒトを除く)の製造方法:

(工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程;

(工程2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程;

(工程3) 当該キメラ胚を宿主動物の子宮に移入し、キメラ動物(ヒトを除く)を得る工程。

(18) 以下の工程を含む、中胚葉系細胞の製造方法:

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を中胚葉系細胞分化条件にて培養し、中胚葉系細胞を得る工程。

(19) 中胚葉系細胞が、血球系細胞、血管内皮細胞および心筋細胞からなる群から選ばれるいずれかである、上記 (18) に記載の製造方法。

(20) 以下の工程を含む、神経系細胞の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を神経系細胞分化条件にて培養し、神経系細胞を得る工程。

(21) 神経系細胞が、神経細胞またはグリア細胞である、上記 (20) に記載の方法。

(22) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む、精巢細胞由来する多能性幹細胞の製造用組成物。

(23) 更に白血病抑制因子 (LIF) を含む、上記 (22) に記載の組成物。

(24) 更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれかを含む、上記 (22) 又は (23) のいずれかに記載の組成物。

【0006】

本発明の製造方法を用いれば、従来出生前の個体（受精卵、胚等）からしか得ることの出来なかった ES 細胞や EG 細胞等の多能性幹細胞を、出生後の個体から製造することが可能である。当該多能性幹細胞を用いれば、自家移植のための組織適合性を有する多様な組織を構築することが可能であり、再生医療、遺伝子治療等の医学分野において有用である。また、当該多能性幹細胞はトランスジェニック動物やノックアウト動物等の遺伝子改変動物の作成に用いることが出来るので、バイオテクノロジー分野において有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明の多能性幹細胞の製造方法は、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む。

【0008】

多能性幹細胞とは、インビトロにおいて培養可能で、長期間にわたって増殖することができ、自己複製能を持ち、生体を構成する全ての細胞やその前駆細胞に分化しうる能力を有する細胞をいう。

【0009】

精巢細胞とは、精巢を構成する全ての細胞を含み、例えば、精原幹細胞、精原細胞、精細胞、精祖細胞、精母細胞、精娘細胞、精子、ライディヒ細胞、セルトリ細胞、間細胞、雄性生殖細胞、生殖細胞等が挙げられる。

【0010】

精巢細胞は、精巢より自体公知の方法で調製することができる。例えば精巢を摘出し、摘出された精巢をコラゲナーゼ、トリプシン、DNase などの分解酵素で消化することにより、精巢細胞を分散させる（例えば、非特許文献 1 等を参照）。精巢細胞は培養液等により洗浄され、本発明の多能性幹細胞の製造に供せられる。

【0011】

当該精巢細胞は、本発明の多能性幹細胞の製造に供せられる前に、培養されていてもよい。培養条件は、特に限定されないが、たとえば、非特許文献 1 に記載されているように、上述の酵素処理で得られた精巢細胞をグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、白血病抑制因子 (LIF) 等の存在下で培養させることにより、精原幹細胞を増殖させてもよい。

【0012】

また、当該精巢細胞は、本発明の多能性幹細胞の製造に供せられる前に、多能性幹細胞を産生する能力の高い画分を濃縮したものであってもよい。当該画分としては、例えば、精原幹細胞、精原細胞、雄性生殖細胞、生殖細胞等がありうる。

【0013】

濃縮方法としては、例えば当該画分の細胞に特異的に発現する細胞表面抗原を認識する抗体を用いて、セルソーターや、抗体磁性マイクロビーズ等を用いる方法などが挙げられる。例えば、精原幹細胞は、 $\alpha 6$ -インテグリン、c-kit等の細胞表面抗原を指標に濃縮することができる(例えば、Proc Natl Acad Sci USA, 97, 8346-8351, 2001等を参照)。あるいはヘキスト等のdyeを用いて精原幹細胞を濃縮することも可能である(例えば、Development, 131, 479-487, 2004等を参照)。

【0014】

本発明において用いられる精巢細胞は、動物由来であれば、特に限定されない。当該動物は脊椎動物、無脊椎動物のいずれであってもよいが好ましくは脊椎動物である。

脊椎動物としては、例えば、哺乳動物、鳥、魚、両生動物および爬虫類動物が挙げられる。哺乳動物としては、特に限られないが、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、オラウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。鳥類としては、ニワトリ、ウズラ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、オーストリッチ、エミュ、ダチョウ、ホロホロ鳥、ハト等を挙げることができる。

脊椎動物は、好ましくは哺乳動物である。

【0015】

当該哺乳動物は、出生前であっても、出生後であってもよいが、好ましくは出生後である。出生後の動物は、新生児、幼児、成体、老体のいずれであってもよいが、好ましくは幼児又は新生児であり、より好ましくは新生児である。新生児を用いる場合の、出生後の日齢は、動物種差があるため一律に設定できないが、例えばマウスにおいては、出生後0～8日が例示される。

【0016】

本発明において、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の均等物とは、ノルトリン(Neurturin)、ペルセフィン(Persephin)、アルテミン(Artemin)等のGDNF様化合物、GDNFレセプター(群)または補助レセプター(群)に対してグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)およびGDNF様化合物と同様の作用を有する他の化合物(例えばGDNFレセプター(群)または補助レセプター(群)を特異的に認識する抗体、GDNFレセプター(群)または補助レセプター(群)に対する作動性化合物等)を含む概念である。このようなレセプター(群)または補助レセプター(群)には、それぞれRetチロシンキナーゼおよびGDNF-ファミリーレセプター α :sが含まれる。

【0017】

GDNF様化合物とは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)と類似の構造を有するか、あるいはそのレセプターまたは補助レセプターに対してグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)のように作用する化合物を意味する。GDNF様化合物としては、特に、ノルトリン、ペルセフィン、アルテミン等が挙げられる。

【0018】

グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)およびGDNF様化合物は構造的に類似し、cRetレセプターチロシンキナーゼは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、ノルトリン、ペルセフィンおよびアルテミンの共通するシグナル伝達レセプターとして作用する。

【0019】

「グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)のように作用する化合物」とは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)のシグナルを伝達するレセプターまたはその補助レセプターに対し、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)と同様に作用する化合物を意味する。

【0020】

「GDNFレセプター」とは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)またはGDNF様化合物の結合物質、すなわち、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)またはGDNF

NF様化合物のシグナルを伝達可能な化合物を意味する。「GDNFレセプター」としては、特に、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)またはGDNF様化合物のシグナル媒介性レセプターであるcRetレセプターチロシンキナーゼが挙げられる。

【0021】

「GDNF補助レセプター」とは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)またはGDNF様化合物のシグナルを伝達しないが、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)またはGDNF様化合物のシグナルを伝達するレセプターを活性化するレセプターを意味する。このような化合物は、特に、そのメンバーがGDNFファミリーレセプター α :s(GFR α)と称されるレセプターである。これらはまた、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、ペルセフィン、アルテミンおよびノルトリンのシグナル伝達レセプター複合体(signaling receptor complex)と関係する。該ファミリーのレセプターとしては4メンバー(GFR α 1~4)(Jing, S., et al., Cell, 85, 9-10 (1996); Jing, S. Q., et al., J. Biol. Chem., 272, 33111-33117 (1997); Treanor, J. J., et al., Nature, 382, 80-83 (1996); Subanto, P., et al., Human Molecular Genetics, 6, 1267-1273 (1997))が既知である。これらは独立してシグナルを伝達することができるが、すべてがリガンド結合およびcRet活性化に不可欠である。

【0022】

本発明の製造方法において、培地中に含まれるグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物の濃度は、通常0.05 ng/ml~100 mg/ml、例えば0.5 ng/ml~100 μ g/ml、好ましくは0.5 ng/ml~10 μ g/ml、より好ましくは0.5 ng/ml~1 μ g/ml、更に好ましくは0.5~200 ng/ml、いっそうより好ましくは0.5~50 ng/ml、最も好ましくは2~20 ng/mlである。

【0023】

本発明の製造方法において用いられる培地は、更に白血病阻害因子(LIF)を含むことが好ましい。

【0024】

本発明の製造方法において、白血病阻害因子(LIF)が培地中に含まれる場合には、その濃度は、通常 $10 \sim 10^6$ units/ml、例えば $10 \sim 10^5$ units/ml、好ましくは $10^2 \sim 10^4$ units/ml、より好ましくは $3 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ units/mlである。

【0025】

本発明の製造方法において用いられる培地は、好ましくは更に上皮細胞成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の少なくともいずれか、より好ましくは両方を含む。

【0026】

本発明の製造方法において、上皮細胞成長因子(EGF)が培地中に含まれる場合には、その濃度は、通常濃度0.05 ng/ml~100 mg/ml、例えば0.5 ng/ml~100 μ g/ml、好ましくは0.5 ng/ml~10 μ g/ml、より好ましくは0.5 ng/ml~1 μ g/ml、更に好ましくは0.5~200 ng/ml、いっそうより好ましくは0.5~50 ng/ml、最も好ましくは2~30 ng/mlである。

【0027】

本発明の製造方法において、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)が培地中に含まれる場合には、その濃度は、通常濃度0.05 ng/ml~100 mg/ml、例えば0.5 ng/ml~100 μ g/ml、好ましくは0.5 ng/ml~10 μ g/ml、より好ましくは0.5 ng/ml~1 μ g/ml、更に好ましくは0.5~200 ng/ml、いっそうより好ましくは0.5~50 ng/ml、最も好ましくは2~20 ng/mlである。

【0028】

本発明において培地に含まれうるサイトカイン(グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、白血病抑制因子(LIF)、上皮細胞成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)等)は、動物由来のもの、好ましくは上述の哺乳動物由来のものであれば特に限定されない。

【0029】

グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) としては、例えば、ヒト及びラット (WO 93/06116 号パンフレット)、マウス (例えば Gene 203, 2, 149-157, 1997 参照) 等のグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) が例示される。

【0030】

白血病阻害因子 (LIF) としては、例えば、ヒト (特開平1-502985号公報)、マウス (特開平1-502985号公報)、ヒツジ (特開平4-502554号公報)、ブタ (特開平4-502554号公報)、ウシ (特開平8-154681号公報) 等の白血病阻害因子 (LIF) が例示される。

【0031】

上皮細胞成長因子 (EGF) としては、例えば、マウス (例えば Nature, 257, 325-327, 1975 参照)、ヒト (例えば Proc Natl Acad Sci USA, 88, 415, 1991 参照) 等の上皮細胞成長因子 (EGF) が例示される。

【0032】

塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) としては、例えば、ヒト bFGF (例えば Endocrine Rev., 8, 95, 1987 参照)、ウシ bFGF (例えば Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6963, 1984 参照)、マウス bFGF (例えば Dev. Biol., 138, 454-463, 1990 参照)、ラット bFGF (例えば Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 256-263, 1988 参照) 等が例示される。

【0033】

また、当該サイトカインは、本発明の多能性幹細胞の製造方法において用いられた際に、当該多能性幹細胞の獲得を達成し得る範囲において、精製された天然、合成または組換えタンパク質、変異体タンパク質 (挿入、置換および欠失変異体を含む)、フラグメント、および化学修飾されたそれらの誘導体を含む。また、上述の各サイトカインの野生型のアミノ酸配列と実質的に相同なタンパク質も含む。

【0034】

変異タンパク質における挿入、置換又は欠失されるアミノ酸の数は通常 1~20 個、好ましくは 1~10 個、より好ましくは 1~5 個、最も好ましくは 1 又は 2 個である。

【0035】

「実質的に相同」とは、野生型のアミノ酸配列に対する相同性の程度が、好ましくは、70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、最も好ましくは 95%以上であることを意味する。相同性の割合 (%) は、(Atlas of Protein Sequence and Structure v.5, p.124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D. C. (1972)) に記載されているとおり、配列の整列を助するために 100 アミノ酸長中に 4 個のギャップを導入しうる場合には、比較する配列中の同一のアミノ酸残基であって整列する 2 種の配列の小さい方に存在するアミノ酸残基の割合 (%) として算出される。また、野生型のアミノ酸配列を有する上記各サイトカインに対する抗体との交差反応性に基づいて単離しうる任意のタンパク質、あるいは上記各サイトカインの野生型のアミノ酸配列をコードする遺伝子または遺伝子セグメントとのストリンジェントな条件下におけるハイブリダイゼーションにより単離される遺伝子によりコードされるタンパク質が、実質的に相同なものとして含まれる。

上記ストリンジェントな条件としては、例えばサムブルックら (Sambrook, J.) の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現 (Expression of cloned genes in E. coli) (Molecular Cloning: A laboratory manual (1989)) Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47-9. 62 及び 11.45-11.61」等に記載されたハイブリダイゼーション条件 (例えば、約 45℃、6.0 × SSC 中におけるハイブリダイゼーション等) が例示される。

【0036】

多能性幹細胞等の幹細胞の培養においては、LIF、EGF、bFGF 等のサイトカインを含む培地を用いることにより、より安定した幹細胞の培養が達成できる。それゆえ、本発明の製造方法において、LIF、EGF、bFGF 等を含む培地を用いることにより

、より安定して多能性幹細胞を製造することができる。

【0037】

本発明の製造方法において用いられる培地の基礎培地は、自体公知のものを用いることができ、特に限定されないが、例えばDMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199、HAM、ATCC-CRCM30、DM-160、DM-201、BME、SFM-101、Fischer、McCoy's 5A、Leibovitz's L-15、RITC80-7、HF-C1、MCDDB107、NCTC135、Weymouth's MB752/1、StemPro-34 SFM等が挙げられる。また、ES細胞培養用等に改変された培地を用いてもよく、上記基礎培地の混合物を用いてもよい。

【0038】

当該培地は、自体公知の添加物を含むことができる。添加物としては、特に限定されないが、例えば成長因子（例えばインスリン等）、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ポリアミン類（例えばプトレシン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、糖類（例えばグルコース等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、ステロイド（例えば β -エストラジオール、プロゲステロン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）等が挙げられる。当該添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。

【0039】

また、当該培地は、血清を含むことができる。血清としては、動物由来の血清であれば特に限定されないが、好ましくは上記哺乳動物由来の血清（例えばウシ胎児血清、ヒト血清等）である。また血清の代替添加物（例えばKnockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen社製)等）を用いてもよい。血清の濃度は特に限定されないが、通常、0.1~30 (v/v) %の範囲である。

【0040】

本発明の製造方法においては、精巢細胞をフィーダー細胞の存在下で培養してもよい。フィーダー細胞としては、特に限定されないが、ES細胞やEG細胞等の多能性幹細胞を多能性を維持しながら培養する際に用いられる自体公知のフィーダー細胞を用いることができ、例えば、繊維芽細胞（マウス胎児繊維芽細胞、マウス繊維芽細胞株STO等）が挙げられる。

フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線（ガンマ線等）照射や抗癌剤（マイトマイシンC等）処理等で不活化されていることが好ましい。

【0041】

本発明の製造方法における細胞培養条件は、細胞培養技術において通常用いられている培養条件を用いることができる。例えば、培養温度は通常約30~40℃の範囲であり、好ましくは約37℃が例示される。CO₂濃度は通常約1~10%の範囲であり、好ましくは約5%が例示される。湿度は通常約70~100%の範囲であり、好ましくは約95~100%が例示される。

【0042】

本発明の多能性幹細胞の製造方法を、更に詳細に説明すると以下の通りである。

【0043】

精巢より分離された精巢細胞を、培地中に懸濁し、細胞培養用容器内に播種し、培養する（第一の培養）。

当該細胞培養用容器は、通常の細胞培養において使用されるものを用いることができるが、好ましくは、精巢細胞の容器への接着を促進させるために、ゼラチン等によってコーティングされている。以下の培養に用いられる容器も同様である。

【0044】

第一の培養を継続することのみによっても、多能性幹細胞を製造することは可能である

が、好ましくは、第一の培養の開始から約6～18時間後（例えば一晚培養後）に、第一の培養における培養細胞、好ましくは浮遊している培養細胞（少なからず生殖細胞を含む）を、別の細胞培養用容器へ継代する（第二の培養）。継代された細胞は、培養条件によっても異なるが、継代後通常1週間以内に、細胞培養用容器の底面にコロニーを形成する。コロニー形成は顕微鏡等を用いて確認することができる。

【0045】

好ましくは、第二の培養の開始から通常5～14日後、細胞をトリプシン処理等により分散し、培地中に再度懸濁して、更に新しい培養用プレートへ継代する（第3の培養）。同様に継代を繰り返すことで、平坦な形状の体細胞は消滅する。従って、2度目あるいは3度目の継代以降は、細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することが好ましい。継代の間隔、細胞の希釈率は、培養条件によって適宜判断されるが、例えば2～5日間隔、1～1/4希釈（培養初期においては好ましくは1～1/2希釈）が例示される。また、確立されたES細胞様コロニーの継代の間隔、細胞の希釈率としては、例えば2～5日間隔、1/4～1/10希釈が例示される。

【0046】

上記培養において、培養された細胞は培養開始後約3～6週間で、2種類の形態のコロニーを形成する。一方のコロニーは、細胞間架橋(intercellular bridge)と桑実胚(morula)様構造により特徴付けられる形態を有しており、これはGS細胞のコロニーである。他方のコロニーは、より硬く詰め込まれ(packed)、ES細胞のコロニーの形態と極めて類似した形態を有しており、これは本発明に係る多能性幹細胞のコロニーである。従って、GS細胞のコロニーと、本発明にかかる多能性幹細胞のコロニーとは、明確に視覚的に識別することができる。

【0047】

上述の形態を指標に、例えば、顕微鏡下で多能性幹細胞のコロニーをパスツールピペット等を用いて選択的にピックアップするか、限界希釈により、多能性幹細胞を単離し得る。あるいは多能性幹細胞の細胞表面マーカー等を指標にして、セルソーター等を用いて多能性幹細胞を単離し得る。

【0048】

本発明の多能性幹細胞の製造方法においては、工程全体を通して、同一組成の培地を用いてもよいが、複数の組成の培地を、経時的に使い分けて用いてもよい。このようにすることで多能性幹細胞をより選択的に増殖させ、多能性幹細胞をより効率よく製造することができる場合がある。

【0049】

例えば、培養に用いる培地を、培養の途中で、精巢細胞の初期の培養に用いる培地（培地Aとする）から、多能性幹細胞の長期培養により適した培地（培地Bとする）へ変換することができる。

【0050】

即ち、培地Aを用いて精巢細胞を培養し、培養細胞を得て、当該培養細胞を培地Bを用いて培養することで、多能性幹細胞を効率よく得ることができる。

【0051】

培地Aに含まれ得るサイトカインは、上述と同様である。

培地Bは上述のサイトカイン（グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、白血病抑制因子(LIF)、上皮細胞成長因子(EGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF))を含まなくてもよいが、好ましくは白血病抑制因子(LIF)を含む。

【0052】

また、培地A、Bにそれぞれ含まれ得る血清の濃度は、上述と同様であるが、培地A中に含まれ得る血清の濃度は、好ましくは0.1～5(v/v)%であり、より好ましくは0.3～3(v/v)%である。培地B中に含まれ得る血清の濃度は、好ましくは2～30(v/v)%であり、より好ましくは10～20(v/v)%である。

【0053】

また、培地 A、B のそれぞれの基礎培地は、上述と同様であるが、培地 A の基礎培地は、精原幹細胞の培養に好適に用いられる基礎培地（例えば StemPro-34 SFM 等）であり得、培地 B の基礎培地は ES 細胞の培養に好適に用いられる基礎培地（例えば DMEM 等）であり得る。

【0054】

培地 A、B が含むことができる添加物は、上述と同様である。

【0055】

培地を培地 A から培地 B に変換する時期は、培養条件等によって異なるため、一律に規定しがたいが、例えばマウスの場合、第一の培養の開始から 10～120 日後、好ましくは 14～40 日後である。

【0056】

更に、培地 A を培地 B へ変換した直後の約 4～40 日間、培地 B にグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を上述の濃度で添加した組成の培地を用いて細胞を培養することにより、より高い効率で多能性幹細胞を製造し得る。

【0057】

またこのような培地 A、培地 B を用いる精巢細胞の培養は上述と同様にフィーダー細胞の存在下で行ってもよい。

【0058】

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、通常 2 ヶ月以上、好ましくは 5 ヶ月以上にわたり、多能性を維持しながら増殖する。

単離された当該多能性幹細胞の維持、培養においては、好ましくは、上述の培地 B が用いられる。

【0059】

本発明の製造方法により得られた細胞が多能性を保持しているか否かは、以下に例示する自体公知の方法により確認することができる。

【0060】

例えば、フローサイトメーター等を用いて、得られた細胞の細胞表面マーカー等の発現が解析される。有用な細胞表面マーカーとしては、SSEA-1 (ES 細胞マーカー)、フォルスマン抗原 (ES 細胞マーカー)、 $\beta 1$ ー及び $\alpha 6$ ーインテグリン (ES 及び GS 細胞マーカー)、EPCAM (ES 細胞及び精原細胞 (spermatogonia) マーカー)、CD9 (ES 細胞及び精原幹細胞マーカー)、EE2 (精原細胞マーカー)、c-kit (分化した精原細胞マーカー) 等が挙げられる。

【0061】

本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、例えばマウス由来の多能性幹細胞であれば、SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ ー及び $\alpha 6$ ーインテグリン、EPCAM、CD9、EE2 及び c-kit からなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性であり、好ましくは、全てが陽性である。また、フォルスマン抗原、EE2 及び c-kit は好ましくは弱陽性である。GS 細胞は SSEA-1 及びフォルスマン抗原が陰性であるので、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は GS 細胞から明確に識別される。

【0062】

ここで細胞表面マーカーの発現が「陽性」とは、細胞表面マーカーが細胞表面上に発現しており、当該細胞表面マーカーに対する特異的抗体による特異的結合が確認できることをいう。「弱陽性」とは、他の細胞と比較して、細胞表面マーカーの発現量が相対的に弱い、細胞表面マーカーの発現量の弱い集団が相対的に多い、又は細胞表面マーカーを発現している細胞集団の割合が相対的に少ないこと等をいう。

【0063】

マウス以外の動物種の多能性幹細胞においても、細胞表面マーカーの発現様式はマウスと同様である。ただし、当該動物種が生来的に保有していないマーカーがある場合は、当該マーカーは解析から除外されるなど、種差が考慮される。

【0064】

また、本発明の製造方法により得られた細胞の細胞内のアルカリフォスファターゼの活性を自体公知の方法により測定することによっても、当該細胞が多能性を保持しているか否かを確認することができる。本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、E S細胞と同様にアルカリフォスファターゼが陽性である。一方、G S細胞はアルカリフォスファターゼが弱陽性乃至陰性であるので、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、G S細胞から明確に識別される。

【0065】

あるいは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)によって、多能性幹細胞に特異的に発現している遺伝子等の発現を解析することによっても、本発明の製造方法により得られた細胞が多能性を保持しているか否かを確認することができる。例えばマウス由来の多能性幹細胞であれば、多能性幹細胞に特異的に発現している遺伝子としては、O c t - 4、R e x - 1、N a n o g等の未分化なE S細胞を維持するのに必須の分子が例示される。本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、O c t - 4、R e x - 1及びN a n o gからなる群から選ばれる少なくともいずれかの遺伝子を発現しており、好ましくは、全ての遺伝子を発現している。G S細胞においてはN a n o gの発現がほとんど認められず、当該多能性幹細胞は、G S細胞から明確に識別される。

【0066】

本発明の製造方法により得られた細胞を、免疫不全動物や免疫寛容を誘導した動物の皮下又は精細管内等へ注入し、テラトーマの形成の有無を解析することによっても、当該細胞の多能性を確認できる。本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞はテラトーマを形成することができ、当該テラトーマ内には3つの胚葉系に分化した多様な細胞（例えば神経、表皮、筋肉、気管支上皮、軟骨、骨等）が確認される。

【0067】

また、本発明の製造方法により得られた細胞を宿主胚に導入し、キメラ動物の誕生の有無を解析することによっても、当該細胞が多能性を保持しているか否かを確認することができる。本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、宿主胚に導入されると、キメラ動物の正常な発生に寄与することができる。

【0068】

また、インビトロにおいてE S細胞を各種の機能細胞へ分化させる自体公知の方法を用い、本発明の製造方法により得られた細胞のインビトロにおける分化能力を解析することによっても、当該細胞の多能性を確認できる。

【0069】

例えば、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、自体公知の中胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、中胚葉系細胞へ分化する。

【0070】

中胚葉系細胞としては、特に限定されないが、例えば、血球系細胞、血管内皮細胞、心筋細胞、骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞等が挙げられる。好ましくは、中胚葉系細胞は、血球系細胞、血管内皮細胞又は心筋細胞である。

【0071】

上記血球系細胞としては、特に限定されないが、例えば血球細胞（例えばC D 4 5陽性細胞など）、赤芽球系細胞（例えばT e r 1 1 9陽性細胞など）、ミエロイド系細胞（例えば単球系細胞（例えばM A C 1陽性細胞など）、好中球系細胞（例えばG r 1陽性細胞など））などが挙げられる。

【0072】

上記心筋細胞としては、例えばM F 2 0陽性細胞などが、上記血管内皮細胞としては、例えばC D 3 1陽性細胞などが挙げられる。

【0073】

中胚葉系細胞分化条件としては、E S細胞を中胚葉系細胞へ分化させる自体公知の条件が挙げられ、特に限定されないが、例えばタイプI Vコラーゲンコートしたプレート中に

おける培養（例えばBlood, vol.93, p1253-1263, 1999等参照）、中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞（例えばOP9細胞などのストローマ細胞）との共培養（例えば「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, p4018-4023, 2003」、「Exp. Hematol., vol.22, p979-984」、「Science, vol.272, 722-724, 1996」等参照）などが挙げられる。

【0074】

本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞を血球系細胞や血管内皮細胞へ分化させる場合には、好適には、当該多能性幹細胞を上述の中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養する（例えば「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, p4018-4023, 2003」、「Exp. Hematol., vol.22, p979-984」、「Science, vol.272, 722-724, 1996」等参照）。

【0075】

また、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞を心筋細胞へ分化させる場合には、好適には、当該多能性幹細胞をSCFの存在下で上述の中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養する（例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, p4018-4023, 2003等参照）。

【0076】

また、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、自体公知の神経系細胞分化条件にて培養することにより、神経系細胞へ分化する。

【0077】

神経系細胞としては、例えば神経細胞（例えばMAP2陽性細胞など）グリア細胞（例えばMBP陽性細胞など）等が挙げられる。

【0078】

神経系細胞分化条件としては、ES細胞を神経系細胞へ分化させる自体公知の条件が挙げられ、特に限定されないが、例えば、神経細胞分化誘導培地（例えばN2B27培地）を用いた培養等が挙げられる（例えばNature Biotechnology, vol.21, 183-186, 2003等参照）。

【0079】

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、半永久的に凍結保存することが可能であって、必要に応じて融解・起眠して使用することができる。当該多能性幹細胞は凍結保存・融解後も多能性を維持する。凍結保存においては、ジメチルスルホキシドとウシ胎児血清アルブミンを含有するセルバンカー（DIA-IATRON社製）等の自体公知の細胞凍結保存用組成物中に細胞を懸濁し、 $-80 \sim -200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは -196°C （液体窒素中）の条件で細胞を保存する。

【0080】

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を凍結保存後起眠させる際には、常法に従って溶媒中で融解し、懸濁して細胞浮遊液とする。融解の方法も特に限定されないが、例えば、 37°C の恒温槽中で、10%胎児ウシ血清を含有するDMEM（DMEM/FCS）を用いて行うことができる。具体的には、恒温槽に凍結チューブを浮かべ、凍結させた細胞へDMEM/FCSを滴下して融解する。細胞を遠心して洗浄した後、培地に再度懸濁する。

【0081】

一度起眠した当該多能性幹細胞を、培養後、再度凍結しても、当該細胞の多能性は維持される。

【0082】

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、長期間にわたって、多能性を維持した状態で増殖することができるので、自体公知の方法で、当該多能性幹細胞の遺伝子を改変し、例えば、特定の外来遺伝子が導入された多能性幹細胞や、特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞等の遺伝子改変多能性幹細胞を製造することができる。

【0083】

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞への遺伝子導入の方法としては、例えば

、特定の遺伝子が機能的に発現できるように構築されたベクターを多能性幹細胞に導入する。ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を用いることができる。また、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、センチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルス等が挙げられる。

【0084】

ベクターを多能性幹細胞に導入する方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法が挙げられる。ウイルスをベクターに用いる場合には、上述の一般的な遺伝子導入法によりウイルスのゲノムを細胞に導入してもよいし、ウイルス粒子を、細胞へ感染させることによって、該ウイルスのゲノムを細胞に導入することができる。

【0085】

特定の外来遺伝子が導入された安定な遺伝子改変多能性幹細胞を選択するには、例えば、ベクターと同時にマーカー遺伝子を細胞へ導入し、マーカー遺伝子の性質に応じた方法で細胞を培養すればよい。例えば、マーカー遺伝子が、宿主細胞に致死活性を示す選抜薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、ベクターが導入された細胞を培養すれば良い。薬剤耐性付与遺伝子と選抜薬剤の組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシンの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンの組み合わせ、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子とブラストサイジンSとの組み合わせなどをあげることができる。

【0086】

特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞を得る方法としては、例えばターゲッティングベクターを用いた相同的組換え（ジーンターゲッティング法）が挙げられる。即ち、特定の遺伝子の染色体DNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすること等によって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（ターゲッティングベクター）を、相同組換え法により多能性幹細胞の染色体に導入し、得られた細胞について当該特定の遺伝子のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した特定の遺伝子のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞を選択することにより得ることができる。或いは、組織特異的または発達段階特異的な様式で特定の遺伝子を欠失させるCre-loxP系等を用いてもよい（Marth, J. D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K. U. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330）。

【0087】

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、生体を構成する全ての体細胞へ分化する能力を有しており、ES細胞やEG細胞に適用される全ての試験技術、方法を当該多能性幹細胞に適用することができ、当該多能性幹細胞を用いて多様な機能細胞、組織、動物（ヒトを除く）等を製造することができる。また上述の方法で遺伝子を改変した多能性幹細胞を用いれば、遺伝子が改変された多様な機能細胞、組織、動物（ヒトを除く）等を製造することができる。

【0088】

例えば、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を上述の中胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、上述の中胚葉系細胞を製造することができる。

【0089】

また、本発明の製造方法により得られるマウスの多能性幹細胞を上述の神経系細胞分化条件にて培養することにより、上述の神経系細胞を製造することができる。

【0090】

その他、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を、例えば、ES細胞を血管内皮細胞へ分化させる方法 (Development, vol.125, 1747-1757, 1998)、ES細胞を神経細胞へ分化させる方法 (Neuron, vol.28, 31-40, 2000)、ES細胞を色素細胞へ分化させる方法 (Development, vol.125, 2915-2923)、ES細胞をインスリン産生細胞へ分化させる方法 (Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11307-11312)、ES細胞を外胚葉系細胞へ分化させる方法 (WO 01/088100号パンフレット)、ES細胞の細胞塊 (エンブリオイドボディ) を形成させることにより内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、血液細胞、内皮細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、グリア細胞、神経細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトを製造する方法 (Reprod.Fertil.Dev., 10, 31, 1998) 等を用いて、多様な機能細胞へと分化誘導することにより、多様な機能細胞を製造することができる。

【0091】

また、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞をヌードマウス等の免疫不全動物や、免疫寛容を誘導した動物に移入することによりテラトーマを形成させ、当該テラトーマ中から多様な機能細胞を単離することもできる。

【0092】

本発明に係る多能性幹細胞を用いた動物 (ヒトを除く) の製造は、例えばキメラ胚を用いる方法等の自体公知の方法に準じて行うことができる。

【0093】

例えば、まず本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る。「宿主」の動物種は、導入される多能性幹細胞の動物種と同一であることが好ましい。「胚」としては、特に限定されないが、例えば胚盤胞、8細胞期胚等が挙げられる。

【0094】

「胚」はホルモン剤 (例えば、FSH様作用を有するPMSGおよびLH作用を有するhCGを使用) 等により過排卵処理を施した雌動物を、雄動物と交配させることに等より得ることができる。多能性幹細胞を宿主胚に導入する方法としては、マイクロインジュクション法や凝集法が知られているが、いずれの方法を用いることも可能である。

【0095】

次に、当該キメラ胚を宿主動物の子宮に移入し、キメラ動物 (ヒトを除く) を得る。宿主動物は好ましくは偽妊娠動物である。偽妊娠動物は、正常性周期の雌動物を、精管結紮などにより去勢した雄動物と交配することにより得ることができる。キメラ胚が移入された宿主動物は、妊娠し、キメラ動物 (ヒトを除く) を出産する。

【0096】

更に、当該キメラ動物 (ヒトを除く) を正常動物と交配し、次世代 (F1) 個体の中から当該多能性幹細胞由来遺伝子を保有する個体を選択することにより、当該多能性幹細胞由来遺伝子を保有する動物 (ヒトを除く) を得ることができる。多能性幹細胞由来遺伝子を保有する動物 (ヒトを除く) の選択は、様々な形質を指標として用いることができるが、例えば体色や被毛色が指標として用いられる。また、体の一部からDNAを抽出し、サザンブロット解析やPCRアッセイを行うことにより、選択を行うこともまた可能である。

【0097】

上述の方法を用いることにより、例えば特定の外来遺伝子が導入された多能性幹細胞から、当該導入された外来遺伝子を保有する動物 (トランスジェニック動物) を得ることができる。また、特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞から、遺伝子欠損ヘテロ接合体動物を得ることができる。更に得られた遺伝子欠損ヘテロ接合体動物を繁殖させることで、遺

伝子欠損ホモ接合体動物を得ることができる。

【0098】

また、本発明は、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む、精巢細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物に関する。当該組成物を含む培地を用いて、上述の方法により精巢細胞を培養することにより、精巢細胞に由来する多能性幹細胞を得ることができる。

【0099】

当該組成物は、更に白血病抑制因子 (LIF) を含むことが出来る。

【0100】

また、当該組成物は、更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれか、好ましくは全てを含むことができる。

【0101】

当該組成物は、更に生理学的に許容される担体、賦形剤、防腐剤、安定剤、結合剤、溶解補助剤、非イオン性界面活性剤、緩衝剤、保存剤、酸化防止剤、上述の添加物、基礎培地などを含むことができる。

【0102】

当該組成物は、等張な水溶液、あるいは粉末等の状態で、本発明の製造方法に用いる培地に添加されるなどして用いられる。あるいは当該組成物は、本発明の製造方法に用いられる培地であってもよい。

【0103】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0104】

実験材料及び方法

(細胞培養)

精巢細胞は、DBA/2マウス、あるいはDBA/2バックグラウンドへかけあわせたトランスジェニックマウス系統C57BL6/Tg14(act-EGFP-0sby01) (以下 Green miceと呼ぶことがある) (大阪大学、岡部博士より提供) の新生児 (生後0~8日齢) から採集された。このGreen miceはEGFP遺伝子を実質的に全ての細胞型において発現しているので、EGFPの蛍光を指標に当該マウス由来の細胞を追跡することが可能である。

【0105】

精巢細胞はコラゲナーゼ (タイプIV、シグマ社製) およびトリプシン (インビトロゲン社製) を用いた2段階酵素分解によって採集された。

即ち、マウスの精巢を摘出し、PBS中で白膜を除去し、1mg/ml コラゲナーゼ (I型) を含むハンクス液中、37℃にて適宜振盪しながら15分間インキュベートし、精細管をほぐした。PBSにより2回洗浄してはがれた間質の細胞を除去した後、1.4mg/ml DNaseを含む0.25%トリプシン液中で37℃にて適宜振盪しながら15分間インキュベートし、精細管をばらばらにした。PBSを加え、トリプシンを不活性化した後、ピペッティングを行って細胞浮遊液を得た。これを20~30μmのナイロンメッシュに通して未消化細胞塊を除去し、600×gで5分間遠心して精巢細胞を回収した。

【0106】

精巢細胞は、ゼラチンコートされた組織培養プレートに配分された。精巢細胞用の培養培地は、StemProサブプリメント (Invitrogen社製)、25μg/ml インスリン、100μg/ml トランスフェリン、60μM プトレシン、30nM セレン酸ナトリウム、6mg/ml D-(+) -グルコース、30μg/ml ピルビン酸、1μl/ml DL-乳酸 (シグマ社製)、5mg/ml ウシアルブミン (ICN バイオメディカル社製)、2mM L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、M

EM非必須ビタミン溶液 (Invitrogen社製)、 10^{-4} M アスコルビン酸、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ d-ビオチン、 $30 \text{ ng}/\text{ml}$ β -エストラジオール、 $60 \text{ ng}/\text{ml}$ プロゲステロン (シグマ社製)、 $20 \text{ ng}/\text{ml}$ マウス上皮細胞成長因子 (EGF: Becton Dickinson社製)、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF: Becton Dickinson社製)、 $10^3 \text{ units}/\text{ml}$ ESGRO (マウス白血病抑制因子: LIF、Invitrogen社製)、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 組換えラットGDNF (R&Dシステムズ社製)、1 (v/v) %胎児ウシ血清 (JRH バイオサイエンス社製) が添加されたStemPro-34 SFM (Invitrogen社製) を使用した。細胞は5%の二酸化炭素を含む空气中で、 37°C で維持された。

【0107】

一晩のインキュベート後に、浮遊している細胞は活発なピペッティングの後に第2培養プレートへ継代された。継代された細胞は1週間以内で増殖してプレートの底に拡がり、コロニーを形成した。

【0108】

細胞はトリプシン処理によって分散され、5~14日間隔 (この間隔をDIVと称することがある) で、生体外の新しい培養プレート ($\times 1 \sim \times 1/2$ 希釈) へ移された。コロニーは、約10日で本来の大きさに成長し、細胞は再び継代された ($\times 1$ 希釈)。2度目あるいは3度目の継代から、細胞はマイトマイシンCで不活性化されたマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) で維持され、2~5日毎に、培養初期は1から $1/2$ 希釈、その後1から $1/4$ 希釈の新しいMEFへ継代された。更に、確立されたES細胞様コロニーは、2~5日毎に $1/4$ から $1/10$ 希釈の新しいMEFへ継代された。

【0109】

ES細胞様コロニーの出現後、細胞は、最終濃度として15 (v/v) % FCS, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール、 $10^3 \text{ units}/\text{ml}$ のESGRO (マウス白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor)、インビトロゲン社製) 及び $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 組換えラットGDNF (R&Dシステムズ社製)、を添加したダルベッコ改変イーグル培地にて培養された。

その後更に細胞は最終濃度として15 (v/v) % FCS, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール、及び $10^3 \text{ units}/\text{ml}$ のESGRO (マウス白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor)、インビトロゲン社製) を添加したダルベッコ改変イーグル培地にて維持された。

【0110】

ES様細胞とGS細胞とは、実体顕微鏡下でコロニーをパスツールピペット等でピックアップすることによっても分離できた。

【0111】

培養細胞のインビトロにおける血球系細胞への分化誘導は、(Science, vol.272, p722-724, 1996) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞をOP9ストローマフィーダー上で培養することにより、血球系細胞への分化を誘導した。

【0112】

培養細胞の、インビトロにおける神経細胞およびグリア細胞への分化誘導は、N2B27培地を用い、(Nature Biotechnology, vol.21, p183-186, 2003) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞を、N2B27培地中、0.1%ゼラチンコート組織培養プラスチックプレートに $0.5 - 1.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した。培地は2日ごとに新しいものと交換した。N2B27は、改変N2 ($25 \text{ g}/\text{ml}$ インシュリン、 $100 \text{ g}/\text{ml}$ アポトランスフェリン、 $6 \text{ ng}/\text{ml}$ プロゲステロン、 $16 \text{ g}/\text{ml}$ プトレシン、 30 nM セレン酸ナトリウム及び $50 \text{ g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンフラクションV (Gibco社製)) を添加したDMEM/F12 (Sigma社製) とB27を添加したNeurobasal培地 (共にGibco社製) との1:1の混合液である。

【0113】

培養細胞の、インビトロにおける心筋細胞への分化誘導は、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, p4018-4023, 2003) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞を、

SCFの存在下、OP9ストローマフィーダー上で培養することにより、心筋細胞への分化を誘導した。

【0114】

培養細胞の、インビトロにおける血管内皮細胞の分化誘導は、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, p4018-4023, 2003)の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞をOP9ストローマフィーダー上において培養することにより、血管内皮—造血前駆細胞へ分化を誘導し、5日後にPECAM-1陽性細胞をソートし、ソートされた細胞をさらにOP9ストローマフィーダー上で培養することにより、血管内皮細胞への分化を誘導した。

【0115】

また、ES細胞としては、129svjマウス由来のものを用いた。

【0116】

(抗体及び染色)

本発明の製造方法で製造された細胞の性質を確認するために、従来公知のES細胞や精子形成細胞等のマーカーの発現を調べるフローサイトメトリーが実施された。

一次抗体としては、ラット抗EpCAM(G8.8)、マウス抗SSEA-1(MC-480)(発生研究ハイブリドーマバンク、アイオワ大学)、ラット抗マウスフォルスマン(Forssman)抗原(M1/87)、ラット抗ヒト α 6-インテグリン(CD49f)(GoH3)、ビオチン化ハムスター抗ラット β 1インテグリン(CD29)(Ha2/5)、APC結合ラット抗マウスc-kit(CD117)(2B8)、ラット抗マウスCD9抗体(BDバイオサイエンス社製)及びラット抗TDA抗原(EE2)(大阪大学西宗博士より提供)が用いられた。APC結合ヤギ抗ラットIgG(Cedarlane社製)、APC結合ストレプトアビジン(BDバイオサイエンス社製)、Alexa Fluor 647結合ヤギ抗ラットIgM、又はAlexa Fluor 633結合ヤギ抗マウスIgM(モレキュラープローブ社製)が二次抗体として用いられた。細胞染色技術は(Proc Natl Acad Sci USA, vol.96, p5504-5509, 1999)の記載に従って実施された。細胞はFACS-Caliburシステム(BDバイオサイエンス社製)で解析した。

【0117】

インビトロで分化させた機能細胞の免疫細胞染色は、標準的なプロトコールを用いて実施された。

即ち細胞を4%パラホルムアルデヒド(PBS中)で固定した。一次抗体としては、抗MAP2ウサギポリクローナル抗体、抗MBPマウスポリクローナル抗体(Chemicon社製)、マウス抗ミオシン重鎖モノクローナル抗体(MF20)、抗CD31モノクローナル抗体を用いた。抗原の局在はCy3を結合させた二次抗体を用いて可視化した。

【0118】

アルカリフォスファターゼ染色は(Nature, vol.352, 809-811, 1991; Cell, vol.44, 831-838, 1986)の記載に従って実施された。

【0119】

(移植及びレシピエントの解析)

テラトーマ形成の解析においては、約 2×10^6 個の培養された細胞がヌードマウスの皮下に注入され、移植から3週間後に解析された。形成された組織は10%中性緩衝ホルマリンで固定され、パラフィン切片の処理がなされた。切片はヘマトキシリンおよびエオジンで染色され、顕微鏡下観察された。全ての動物実験のプロトコールは、京都大学の動物保護および使用制度委員会によって承認されたものである。

【0120】

(キメラ形成)

C57BL/6マウスの3.5 dpc 胚盤胞の割腔(blastocoel)内に10から15個のGreen mice由来の培養された細胞が注入された。胚盤胞は2.5dpcの偽妊娠ICR里親マウスの子宮に戻された。約70%の細胞が注入時に、ES細胞注入後のキメラズムの割合や生殖系列への伝達(germline transmission)に影響を及ぼす正倍数性核型(euploid karyotype)を保持していた。

12.5 dpcの胎児マウスを摘出し、UV光下実体顕微鏡を用いて観察した。また、当該胎児マウスの凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いてGreen mice由来のEGFPの蛍光を指標にキメリズムを解析した。対照染色としてはPIを用いた。

また自然分娩により出産されたキメラマウス新生児を、UV光下実体顕微鏡を用いて観察した。

【0121】

(RT-PCR)

RT-PCRによるOct-4、HPRT、Rex-1及びNanogの発現の解析は、(Science, vol.297, 392-395, 2002; Mol. Cell. Biol., vol.13, 473-486, 1993; Cell, vol.113, 631-642, 2003; PNAS, vol.100, 14926-14931, 2003)の記載に従って実施された。

【0122】

結果

新生児のDBA/2マウスの精巣をGDNF、bFGF、EGFおよびLIFを含有する培養液中で培養した際に、コロニーの大部分は、細胞間架橋(intercellular bridge)と桑実胚(morula)様構造により特徴付けられる、GS細胞の典型的な外観を有していた。しかしながら、少数(<5%)のコロニーはES細胞への著しい類似を呈していた(図1)。これらのコロニーはより硬く詰め込まれ(packed)、通常培養開始後3から6週間以内に出現した。

【0123】

これらのES細胞様コロニーは、FCS、2-メルカプトエタノール、マウス白血病阻害因子(LIF)、及びグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用いて、マウス胎児繊維芽細胞フィーダー上にて培養すると、数の増加により選択的に増殖した。2から3回の継代後、培養中のほとんどのコロニーはES細胞様コロニーとなった。これらのES細胞様コロニーはES細胞培養条件(FCS、2-メルカプトエタノール及びマウス白血病阻害因子(LIF)を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用いて、マウス胎児繊維芽細胞フィーダー上にて培養)にて維持することが可能であった。この後、細胞をES細胞培養条件下で維持する限りは、形態は変化しなかった。

【0124】

当該ES様細胞は、インビトロで、30回の継代で5ヶ月以上、未分化状態を維持しながら増殖した。これらの結果は再現性があった。なぜなら、異なる染色体型(ICR等)や齢(0から8日齢)のマウスを含む9回の実験において、9回とも同様な細胞が獲得されたからである。しかし、ES様コロニー形成の頻度は齢とともに低下した。興味深いことに、完全に確立されたGS細胞をES細胞培養条件下で培養しても、上記ES細胞様コロニーは出現しなかった。

【0125】

これらのES様細胞の表現型を調べるために、Green miceからの培養を確立した。当該miceはEGFP(enhanced green fluorescent protein)を、精子原細胞を含めてユビキタスに発現しているので、UV光励起により培養細胞をフィーダー細胞から識別することができる。

【0126】

上記培養細胞中のEGFP陽性の細胞(ES様細胞)について表面抗原の発現をフローサイトメーターにより解析した。図2(a)~(h)に示されるように、当該細胞は、SSEA-1(ES細胞マーカー)、 β 1-及び α 6-インテグリン(ES及びGS細胞マーカー)、EpCAM(ES細胞及び精原細胞(spermatogonia)マーカー)およびCD9(ES細胞及び精原幹細胞マーカー)が陽性であり、フォルスマン抗原(ES細胞マーカー)、EE2(精原細胞マーカー)及びc-kit(分化した精原細胞マーカー)が弱陽性であった。

【0127】

これとは対照に、GS細胞はSSEA-1及びフォルスマン抗原が完全に陰性であるこ

とから(図3(a)、(f))、当該ES様細胞はGS細胞とは異なる表現型を有することが示唆された。また、GS細胞は $\beta 1$ -及び $\alpha 6$ -インテグリン、EpCAM、CD9、EE2及びc-kitが陽性であった。(図3(b)~(e)、(g)、(h))。

【0128】

また、ES細胞はSSEA-1、 $\beta 1$ -及び $\alpha 6$ -インテグリン、EpCAM、CD9、フォルスマン抗原及びc-kitが陽性であり、EE2は弱陽性であった(図4(a)~(h))。

【0129】

培養開始前の精巣細胞は、SSEA-1が陰性であり、40%程度の集団がフォルスマン抗原陽性であった(図5)。

【0130】

当該ES様細胞は、ES細胞に特徴的であるアルカリフォスファターゼが強陽性であった(図6(a))。一方GS細胞はアルカリフォスファターゼが弱陽性乃至陰性であり(図6(b))、当該ES様細胞はGS細胞とは異なる表現型を有することが示唆された。

【0131】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)によって、これらのES様細胞はOct-4、Rex-1及びNanogなどの未分化なES細胞を維持するのに必須の分子を発現していることが示された(図7)。これらの結果は、当該ES様細胞は、ES細胞と表現型が類似していることが示唆された。一方、GS細胞においてはNanogの発現がほとんど認められず、当該ES様細胞はGS細胞とは異なる表現型を有することが示唆された(図7)。

【0132】

当該ES様細胞がインビトロで他の系列へ分化することができるかを決定するために、Green mice由来のES様細胞をOP9ストローマフィーダー細胞と共培養した。OP9ストローマフィーダー細胞はES細胞の血球細胞への分化を支持できる。

共培養開始から10日後、EGFP陽性細胞(ES様細胞)の一部が血球系細胞へ分化した(図8a)。血球系細胞には、赤芽球(Ter119陽性細胞)、血球細胞(CD45陽性細胞)、ミエロイド系細胞(ミエロイド前駆細胞、単球系細胞(Mac1陽性細胞))、好中球系細胞(Gr1陽性細胞))が含まれていた(図8b~c、図9)。

【0133】

また、当該ES様細胞を上述の条件で培養した結果、当該ES様細胞の一部が、心筋細胞(MF20陽性細胞)、血管内皮細胞(CD31陽性細胞)、神経細胞(MAP2陽性細胞)、グリア細胞(MBP陽性細胞)へ分化した(図8d~g)。

【0134】

当該ES様細胞の分化特性を、ヌードマウスへの分離された培養細胞の皮下注入によって、インビボでさらに解析した。移植後3週間で、全てのレシピエント(8/8)において、移植された細胞は典型的なテラトーマを生じた。当該癌(テラトーマ)には、3つの胚葉(embryonic germ layer)の派生物、例えば神経、表皮、筋肉、気管支上皮、軟骨、骨等が含まれていた(図8h)。同様の結果が3つのクローンを用いて得られた。これとは対照に、GS細胞や新鮮な精巣細胞をヌードマウスの皮下へ移植しても、明らかな癌形成は認められなかった。従って、当該ES様細胞は、ES細胞と類似した様式で、多様な体細胞系列へ分化する特性を有することが示された。

【0135】

当該ES様細胞は精巣からの起源であるので、生殖系列細胞への分化能力は、精原細胞移植の技術により試験された(例えば、特表1995-501705号公報参照)。この方法は、精原幹細胞により、不妊動物の空の精細管を再コロニー化(recolonize)させて、成熟精子へ分化させる。当該培養細胞を免疫抑制されたWマウス内に移植した。このマウスは先天的に不妊であって、精細管内に内在性の生殖細胞を有していない。移植後1ヶ月で、全てのレシピエント動物(10/10)は精巣内にテラトーマを発生した。精細管組織は乱れており、組織学的解析では精子形成の兆候はなかった。テラトーマ内に認められた細胞の

型は、皮下注入により発生させたものと同様であり、このことは精細管の微小環境は当該培養細胞の分化パターンに影響しないことを示している。これとは対照に、GS細胞が精細管内に注入されたときには、移植後2ヶ月以内に正常な精子形成が認められた。

【0136】

更に当該ES様細胞のインビボにおける分化特性を調べるために、当該ES様細胞を胚盤胞内に注入した。なぜなら、ES細胞は胚盤胞へ入り(colonize)、生殖系列を含む、体内の全ての細胞型に寄与するからである。10から15個のGreen mice由来のES様細胞を120個のB6の胚盤胞内に注入した。インビトロで24時間培養後、当該キメラ胚は12匹の偽妊娠レシピエントマウスの子宮に戻された。胎生12.5日において胎児は正常に発生し(図10(a))、胎児の全身においてEGFPの発現が認められた(図10(b))。ドナー細胞の寄与は胎児の脳、腸管、心臓、肝臓、神経管及びその他の組織において認められた(図11(a)～(f))。

また、キメラマウス胎児は胎生12.5日以降も正常に発生し、自然分娩により出産された(図12)。

従って、インビボにおいても当該ES様細胞は生体のあらゆる体細胞に分化しうる能力を有することが示された。

【0137】

(考察)

上記試験の結果は、出生後の精巣の中に多能性の幹細胞の存在を明らかにした。精巣由来のES様細胞は、ES/EG細胞の出生後の相対物(counterpart)でありうる。EG細胞は生殖細胞からの多能性幹細胞の単離の例でしかないと考えられる。EG細胞は胎児の始原生殖細胞(PGC)から獲得されるが、そのような細胞は、細胞をインビボでテラトーマ形成させた後に培養するケースを除けば、出生後の生殖細胞からは単離できない。しかしながら、本発明に係るES様細胞の派生物の頻度は自然に起こるテラトーマの頻度よりも有意に高いので、当該ES様細胞はテラトーマ由来ではなさそうである。従って、多能性細胞を形成する能力は生殖系列に内在しうる。これらの細胞を、生殖系列にのみ分化できるGS細胞と識別するために、多能性生殖系列幹細胞(multipotent germline stem cells: mGS細胞)と呼ぶことを提案する。

【0138】

本発明において、提案される一つの重要な問題は、mGS細胞の起源である。一つの可能性は、mGS細胞は胎児期から存続していたES様細胞の過渡的な集団を反映していることである。新生児精巣中の雄性生殖細胞(gonocyte)は異成分性(heterogenous)であると報告されている；偽足性(pseudopod)雄性生殖細胞は精原細胞移植の後に精子形成を生ずる能力を有す一方、円形(round)雄性生殖細胞は精子形成を生じず、インビトロでアポトーシスを起こす。精原幹細胞活性に関してmGS細胞はGS細胞とは異なっているのも、mGS及びGS細胞は異なった雄性生殖細胞の型を起源としているかもしれない。

【0139】

もう一方の可能性は、多能性が精原幹細胞の一つの特徴であることである。それらの潜在性にかかわらず、精原幹細胞はインビボにおいて多系列分化を起こさないように厳しい調節の下にあり、生殖系列分化へ制限されているかもしれない。実際に、テラトジェネシス(teratogenesis)は環境の影響に対して感受性が強く、インビボにおいて胎児生殖堤(fetal genital ridge)の子宮外(ectopic)移植によりテラトーマ形成は有意に高められる(～50倍)。加えて、本発明の多能性幹細胞の製造方法において、培養開始後の早い時点における継代による体細胞の希釈が、mGS細胞の樹立に有効であることから、精巣の環境は多系列分化にとって抑制的であるようである。多能性の獲得が精原幹細胞潜在力の喪失と同時に起こっていることは興味深い。精巣起源であるにもかかわらず、mGS細胞は精細管中に戻して移入されたときに、テラトーマを形成することは、精細管の環境はもはや生殖細胞分化を支持できないことを示している。これは、長期間培養後に正常な精子形成を生ずることができるGS細胞とは対照的である。精原幹細胞潜在力の喪失の理由は現在知られていない；しかしながら、これはmGS細胞の樹立過程の間におけるGDNF

に対する反応性の喪失と関連しているかもしれないと推測される。なぜなら GDNF はインビボにおいて精原幹細胞の自己更新 (self-renewing) 分裂を促進するための必須因子であるからである。

【0140】

これらの事柄を明確にするための更なる研究が必要であるが、精原幹細胞活性の喪失は、mGS細胞が生殖系列能力を有さないことを必然的には示さないことに言及しておくことも重要である。ESおよびEG細胞が胚盤胞注入によって生殖系列キメラを産生するのに寄与することを考えれば、mGS細胞も生殖系列潜在力を保持していることを推測することは合理的であるかもしれない。キメラ動物がmGS細胞由来の仔を生ずることができるか、検討中である。

【0141】

出生後の精巣からの多能性幹細胞の派生は、医学における重要な実用価値を有する。本発明の製造方法により製造されたmGS細胞は、他に報告された出生後動物から得られた多能性細胞とは、形態学、マーカーの発現、および分化能力の点から異なっている。個々の細胞型の生物学を研究し、臨床応用の可能性を評価するのは重要であるが、mGS細胞は、ES細胞から特定の系列の細胞を引き出すための技術を直接適用できる点で重要な利点を有している。mGS細胞は出生後の動物から動物を犠牲にすることなく獲得することができるので、mGS細胞の派生はES細胞と比較して倫理上の問題もより少ない。また自家移植のために、組織適合性で多能的な組織を利用できることは、ES細胞を基礎とした技術に関連した免疫学的問題を回避することもできるであろう。この意味において、成体の精巣から多能性幹細胞を派生させる可能性、及び、インプリンティングの影響も含めて、その分化能力の範囲を試験することは重要であろう。

【0142】

出生後の雄性生殖細胞は精子を産生するために完全にコミットしていると考えられていたが、本発明は、その多能性を証明し、またES様幹細胞を派生する源として精巣が役立つことが示唆された。GS細胞と併せて、ここに述べた新たな幹細胞株は、生殖系列の生物学の理解に重要な関わりあいがあり、バイオテクノロジーおよび医学のための比類のないツールを提供する。

【産業上の利用可能性】

【0143】

本発明の製造方法を用いれば、従来受精卵や胚などからのみ得ることの出来た多能性幹細胞を、出生後の個体から製造することが可能である。当該多能性幹細胞を用いれば、自家移植のための組織適合性を有する多様な組織を構築することが可能であり、再生医療、遺伝子治療等の医学分野において有用である。また、また、当該多能性幹細胞はトランスジェニック動物やノックアウト動物等の作成に用いることが出来るので、バイオテクノロジー分野において有用である。

【図面の簡単な説明】

【0144】

【図1】GS細胞および、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞のコロニーの形態を表す写真である。a～dの各図において、右下の線はいずれも50μmを示す。aは培養の初期段階においてGS細胞(白三角)および当該多能性幹細胞(白矢印)のコロニーが混在している状態を示す写真である。bは培養の初期段階における当該多能性幹細胞のコロニーの形態を示す写真である。多能性幹細胞同士がより詰め込まれている(packed)。cは完全に確立された当該多能性幹細胞のコロニーの形態を示す写真である。コロニーの形態が完全にES細胞コロニー様となっている。dは典型的なGS細胞のコロニーの形態を示す写真である。

【図2】本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)はβ1-インテグリン、(c)はα6-インテグリン、(d)はEPCAM、(e)はCD9、(f)はフォルスマン抗原、(g)はEE2、(h)はc-Kitの各発現を示す。縦軸には細胞数

(個)を、横軸には各細胞表面マーカーの発現を相対的蛍光強度として示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 85.14%、(b) 93.72%、(c) 97.98%、(d) 96.36%、(e) 99.11%、(f) 25.38%、(g) 92.29%、(h) は57.88%である。

【図3】GS細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)は $\beta 1$ -インテグリン、(c)は $\alpha 6$ -インテグリン、(d)はEPCAM、(e)はCD9、(f)はフォルスマン抗原、(g)はEE2、(h)はc-kitの発現を示す。縦軸には細胞数(個)を、横軸には各細胞表面マーカーの発現を相対的蛍光強度として示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 0.67%、(b) 84.83%、(c) 99.70%、(d) 99.20%、(e) 99.11%、(f) 1.72%、(g) 92.78%、(h) は64.14%である。

【図4】ES細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)は $\beta 1$ -インテグリン、(c)は $\alpha 6$ -インテグリン、(d)はEPCAM、(e)はCD9、(f)はフォルスマン抗原、(g)はEE2、(h)はc-kitの発現を示す。縦軸には細胞数(個)を、横軸には各細胞表面マーカーの発現を相対的蛍光強度として示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 96.46%、(b) 99.69%、(c) 97.23%、(d) 96.10%、(e) 99.68%、(f) 79.11%、(g) 81.78%、(h) は93.90%である。

【図5】培養開始前における精巣細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)はフォルスマン抗原の発現を示す。縦軸には細胞数(個)を、横軸には相対的蛍光強度を示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 0.92%、(b) 43.02%である。

【図6】アルカリフォスファターゼ染色の結果を表す図である。(a)は本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞のコロニー、(b)はGS細胞のコロニーである。

【図7】RT-PCRの解析結果を表す図である。GS細胞(GS)及び本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞(mGS)のOCT-4、Rex-1、Nanog、HPRTの発現を示す。

【図8】本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞から分化した機能細胞を示す図である。aはOP9細胞上で発生した血球系細胞を示す図である。bはインビトロで分化した血球系細胞の細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで解析した結果を表す図である。縦軸には細胞表面マーカーの発現(左から、ネガティブコントロール、Ter119、CD45)を、横軸には前方散乱を示す。cはインビトロで分化した血球系細胞をギムザ染色した結果を表す図である。三角はミエロイド前駆細胞を、矢印は赤芽球を示す。dはインビトロで分化した心筋細胞を表す図である(MF20染色)。eはインビトロで分化した血管内皮細胞を表す図である(CD31染色)。fはインビトロで分化した神経細胞を表す図である(MAP2染色)。gはインビトロで分化したグリア細胞を表す図である(MBP染色)。hはテラトーマの組織学的観察結果を示す図である。

【図9】フローサイトメトリー解析の結果を表す図である。(a)はネガティブコントロール、(b)はTer119、(c)はCD45、(d)はMac1/Gr1(Mixで染色)の解析結果を示す。(a)~(d)中、上側のドットプロットに



において、縦軸には各細胞表面マーカーの発現を、横軸には E G F P の発現を相対的蛍光強度としてそれぞれ示す。(a) ~ (d) 中、下側の表は、各 4 分割ゲート（左上、右上、左下、右下）におけるプロット数（イベント）、全生存細胞数に対する割合（%ゲート）、全細胞数に対する割合（%全体）を示す。

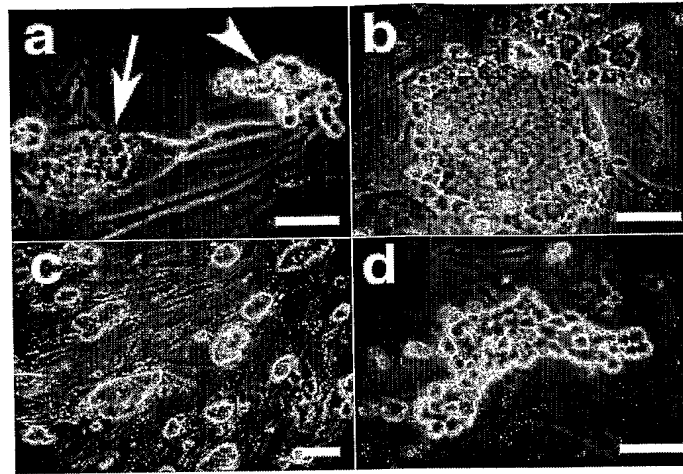
【図 1 0】マウス胎児の拡大図である。(a) は可視光下、(b) は U V 光下での観察結果をしめす。(a)、(b) それぞれの図において、左側は同腹の正常胚由来の胎児を、右側はキメラ胚由来の胎児を示す。

【図 1 1】キメラマウス胎児の凍結切片の蛍光顕微鏡による組織学的観察結果を示す図である。(a) は脳を、(b) は心臓を、(c) は神経管上部を、(d) は腸管を、(e) は肝臓を、(f) は神経管下部を、それぞれ示す。

【図 1 2】キメラマウス新生児の U V 光下での観察結果を示す。

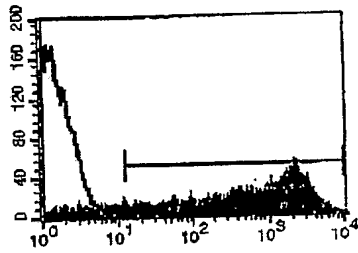


【書類名】 図面
【図 1】

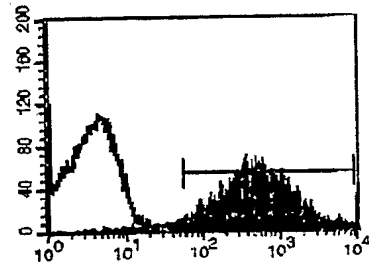


【図 2】

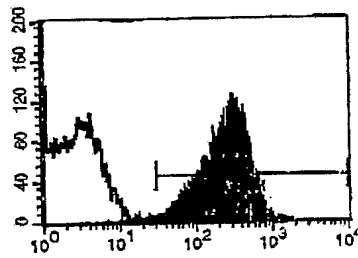
(a)



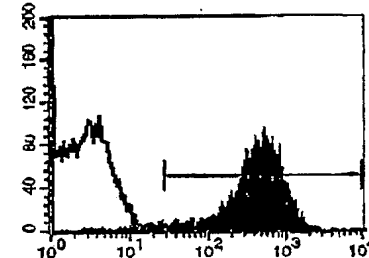
(b)



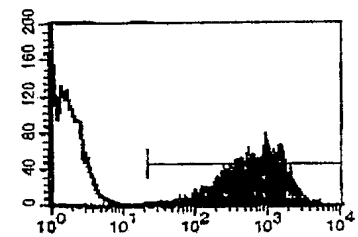
(c)



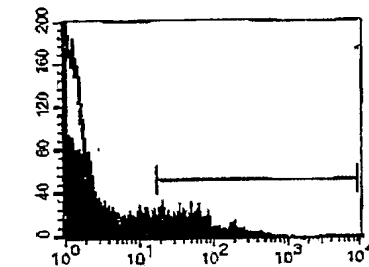
(d)



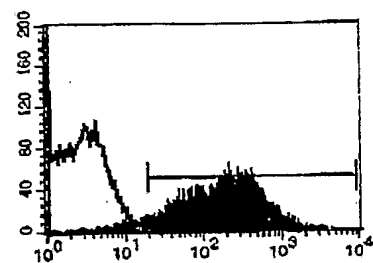
(e)



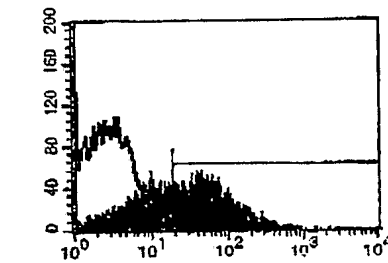
(f)



(g)

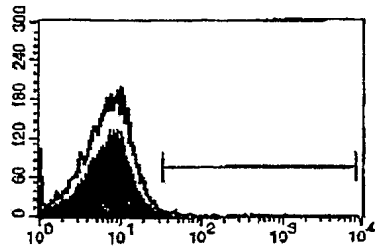


(h)

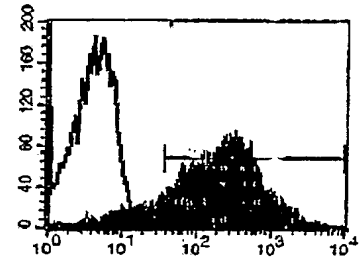


【図 3】

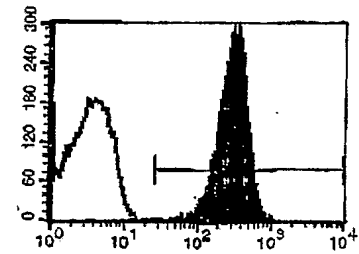
(a)



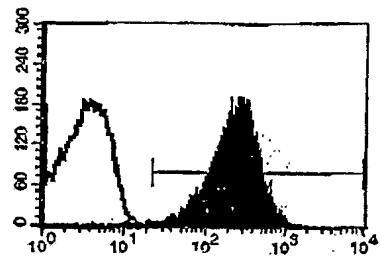
(b)



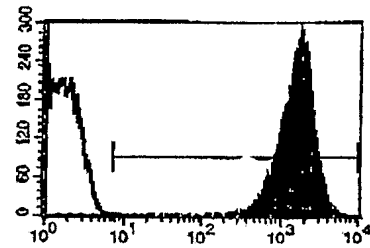
(c)



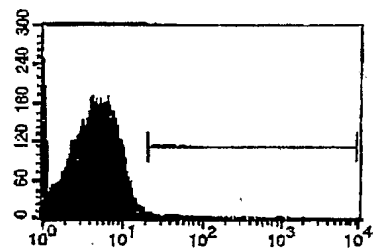
(d)



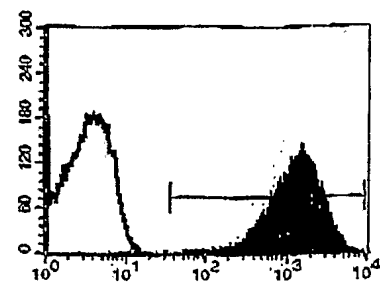
(e)



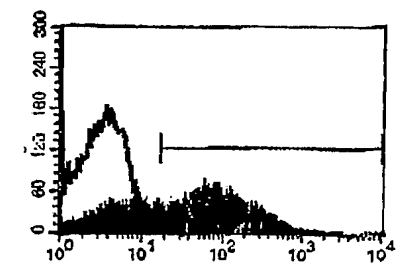
(f)



(g)

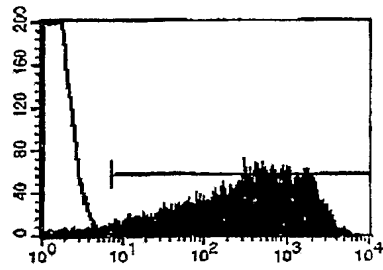


(h)

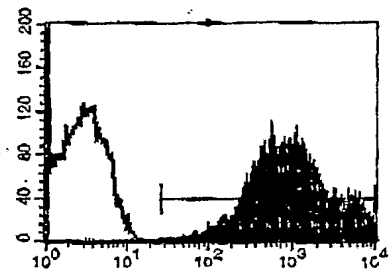


【図 4】

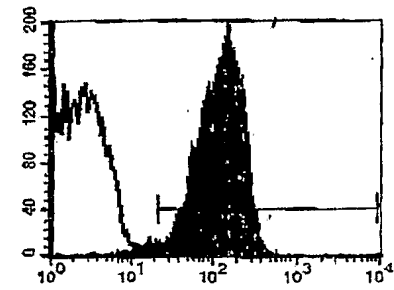
(a)



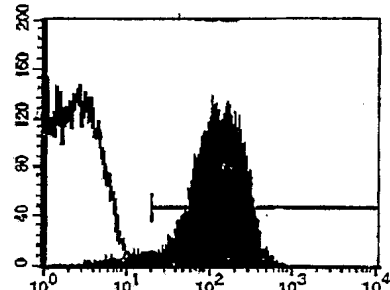
(b)



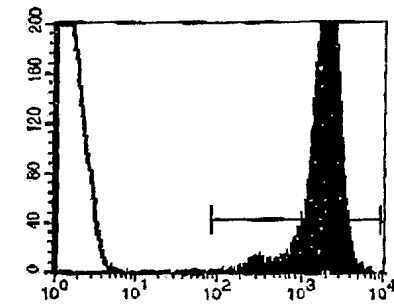
(c)



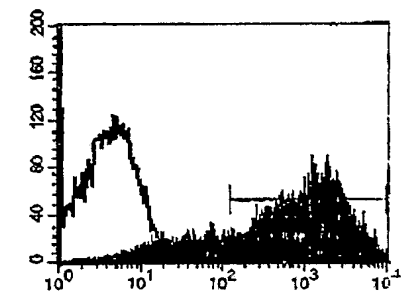
(d)



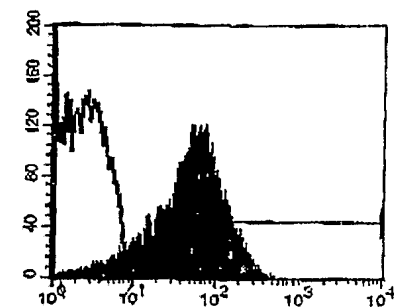
(e)



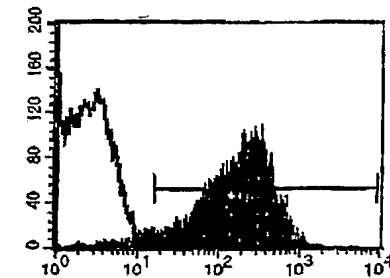
(f)



(g)



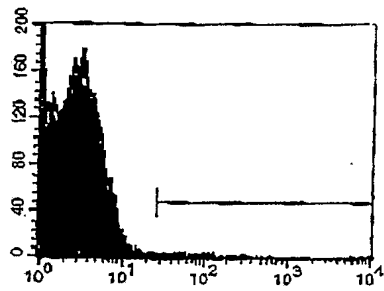
(h)



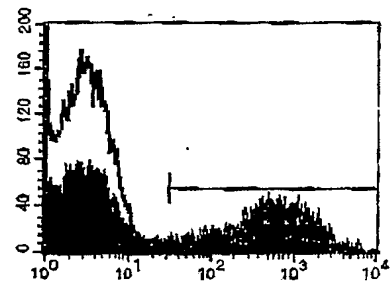


【図 5】

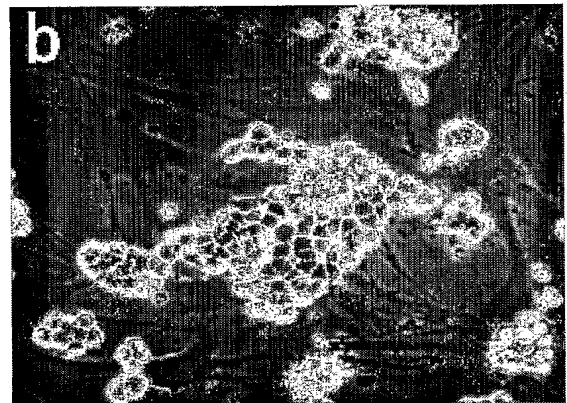
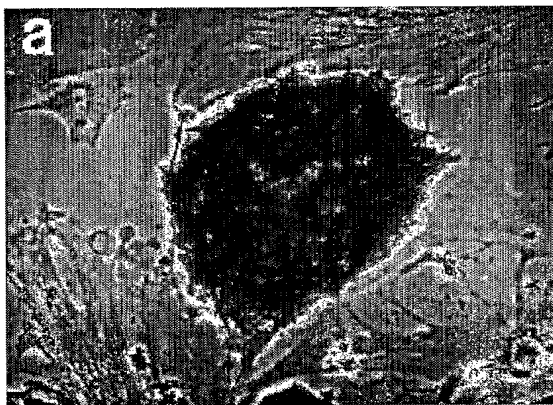
(a)



(b)

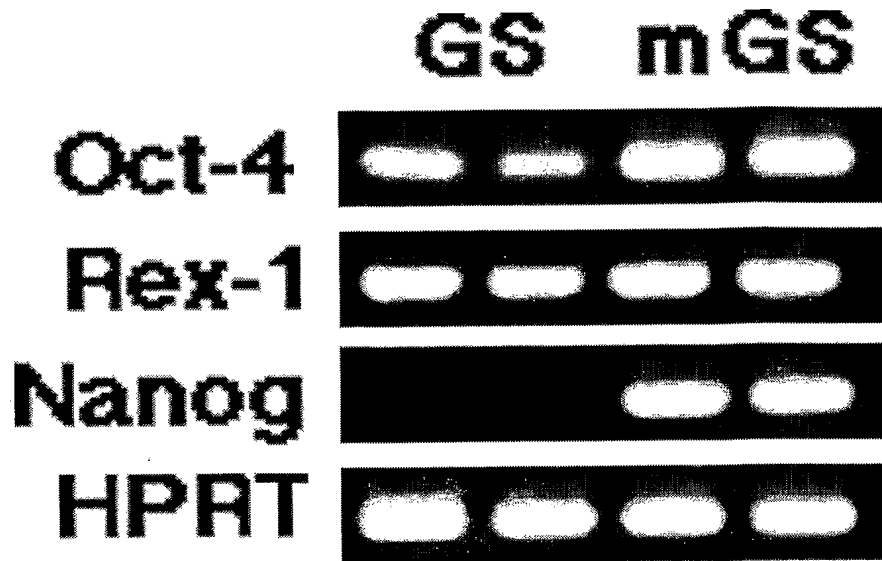


【図 6】

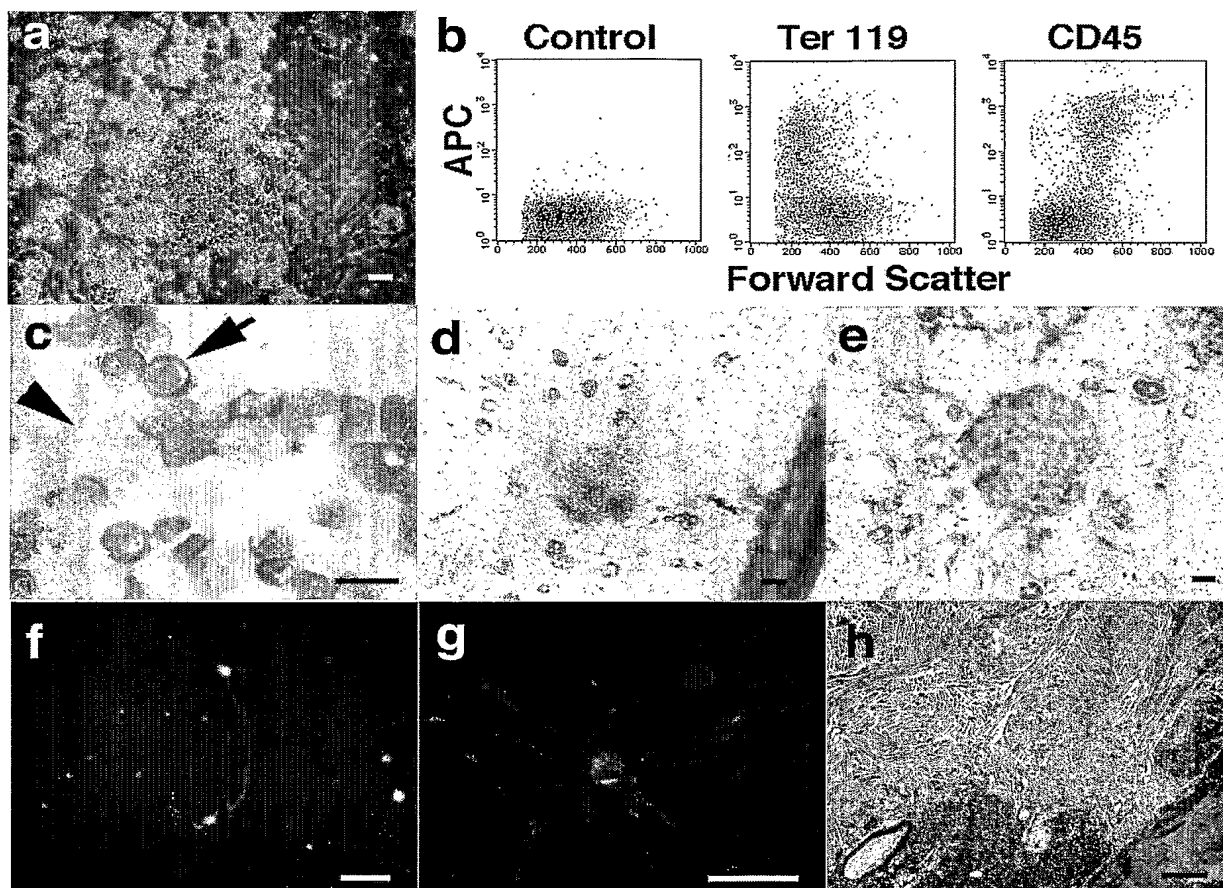




【図 7】

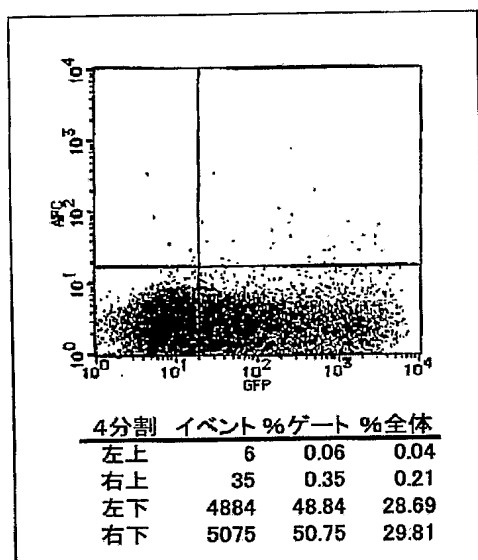


【図 8】

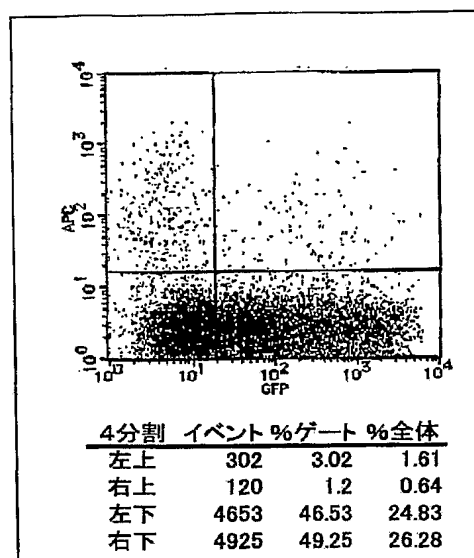


【図9】

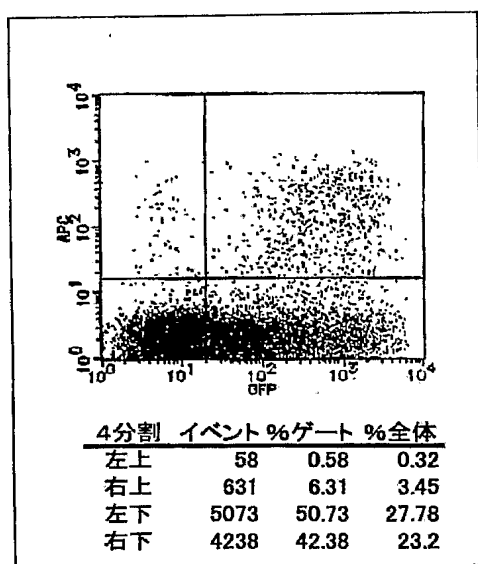
(a)



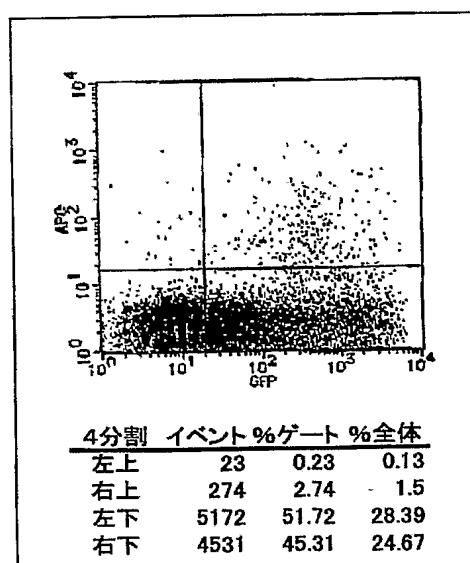
(b)



(c)

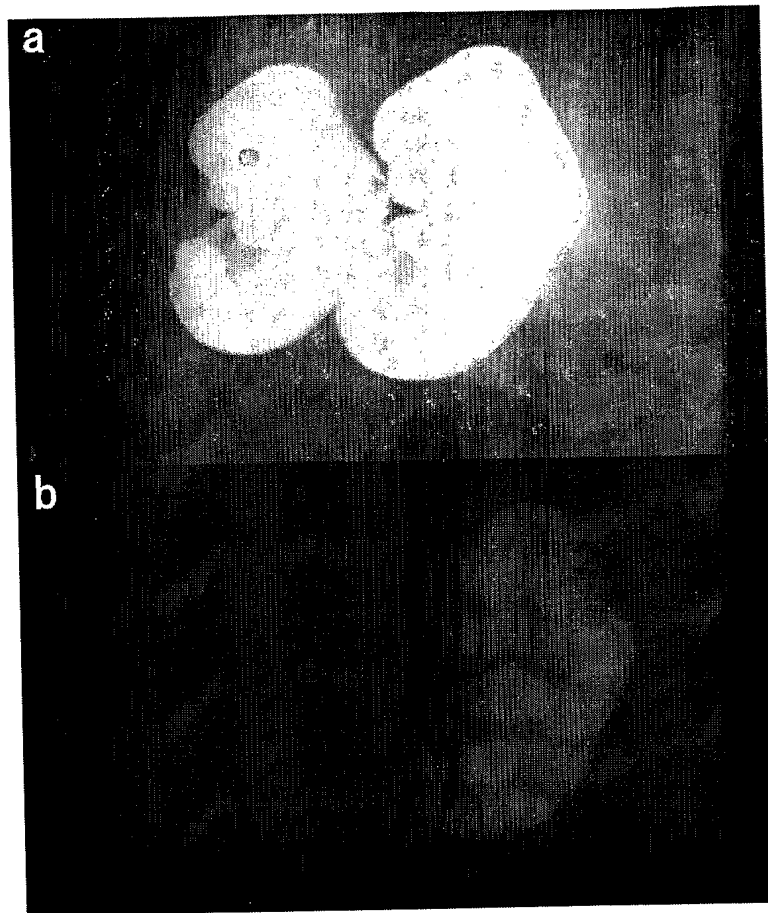


(d)

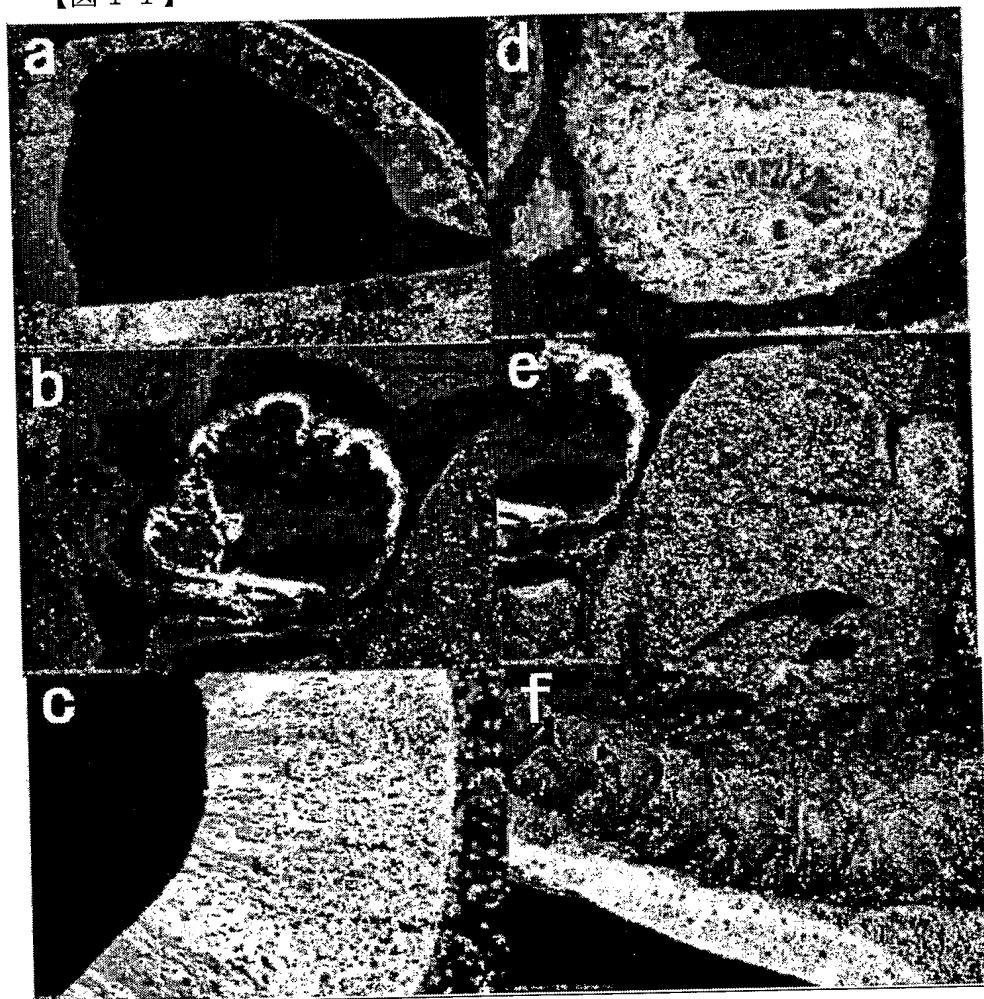




【図 10】

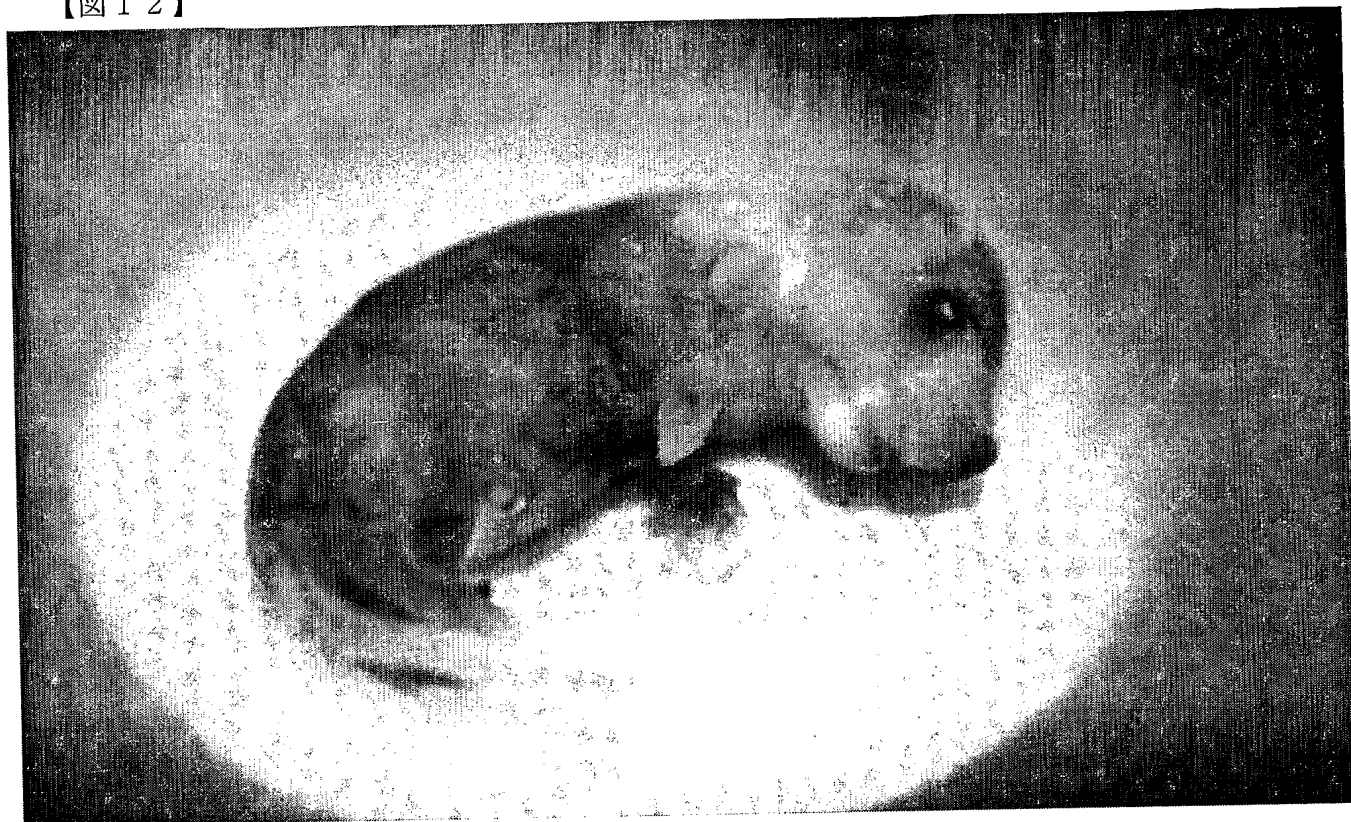


【図 11】





【図 12】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 出生後の個体から多能性幹細胞を製造する新たな方法を提供すること

【解決手段】 本発明は、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む、多能性幹細胞の製造方法を提供する。当該培地は更に白血病抑制因子（LIF）、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）等を含むことができる。本発明の製造方法を用いれば、従来受精卵や胚などからのみ得ることの出来た多能性幹細胞を、出生後の個体から製造することが可能である。当該多能性幹細胞を用いれば、自家移植のための組織適合性を有する多様な組織を構築することが可能であり、再生医療や遺伝子治療等の医学分野において有用である。また、当該多能性幹細胞はトランスジェニック動物やノックアウト動物等の作成に用いることが出来るので、バイオテクノロジー分野において有用である。

【選択図】 なし



特願 2004-101320

ページ： 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[503310763]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

2003年 8月27日
新規登録
京都府京都市左京区吉田牛の宮町11-1
社団法人芝蘭会